

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 04 AUG 2000  
PCT/JP 00/03373  
WIPO PCT

15.06.00

09/979,509

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

JP00/03373

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 5月25日

出 願 番 号

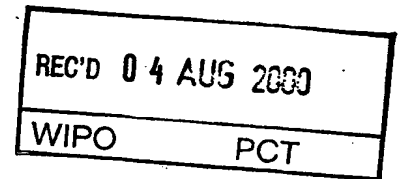
Application Number:

平成11年特許願第144336号

出 願 人

Applicant (s):

ウェルファイド株式会社



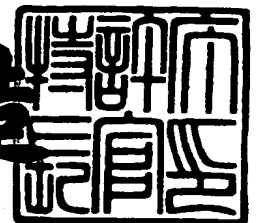
4

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3057331

【書類名】 特許願

【整理番号】 F3208

【提出日】 平成11年 5月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/415

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県入間市小谷田 3 丁目 7 番 2 5 号 吉富製薬株式会社 創薬研究所内

【氏名】 川崎 雅一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府枚方市招提大谷 2 丁目 2 5 番 1 号 吉富製薬株式会社 創薬研究所内

【氏名】 後藤 信治

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府枚方市招提大谷 2 丁目 2 5 番 1 号 吉富製薬株式会社 創薬研究所内

【氏名】 林 義治

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県築上郡吉富町大字小祝 9 5 5 番地 吉富製薬株式会社 開発研究所内

【氏名】 川崎 和幸

【特許出願人】

【識別番号】 000006725

【氏名又は名称】 吉富製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100066304

【弁理士】

【氏名又は名称】 高宮城 勝

【電話番号】 06(6201)1908

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013114

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000146

【プルーフの要否】 要

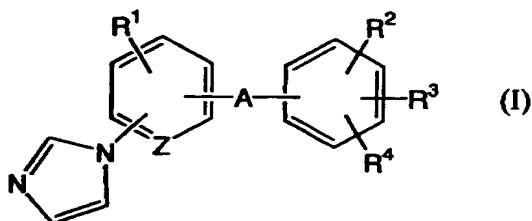
【書類名】 明細書

【発明の名称】 MAG発現促進剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I)

【化1】



(式中、 $R^1$  は水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシを示す。

$R^2$ 、 $R^3$  は同一または異なって水素、アルキルを示す。

$R^4$  はアルキル、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COOR}^5$ 、 $-\text{CONR}^6 \text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2 \text{NR}^6 \text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2 \text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2 \text{OR}^8$  を示す。

ここで、 $R^5$ 、 $R^8$  はアルキルを示し、 $R^6$ 、 $R^7$  は同一または異なって水素、アルキルを示すか、 $R^6$ 、 $R^7$  が結合して隣接する窒素原子とともに形成するイミダゾールを示す。

Aは $-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-$ を示す。

Zは $=\text{CH}-$ 、 $=\text{N}-$ を示す。)

で表される化合物、その光学活性体またはその医薬上許容される塩類を含有するMAG発現促進剤。

【請求項2】 MAG発現促進剤の適応疾患がミエリン形成不全に起因する疾患である請求項1記載のMAG発現促進剤。

【請求項3】 MAG発現促進剤の適応症が髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患である請求項1記載のMAG発現促進剤。

【請求項4】 MAG発現促進剤の適応症が多発性硬化症 (Multiple sclerosis)、脳炎 (Encephalitis)、脊髄炎 (Myelitis)、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎、重金属中毒、ジフテリア中毒、甲状腺機能低下症、異染性白質変性症、Charcot-Marie-Tooth 病である請求項1記載のMAG発現促

進剤。

【請求項 5】 MAG 発現促進剤が一般式 (I) 中、 $R^1$  がハロゲン、アルコキシまたはアルキルである請求項 1 ~ 4 記載の MAG 発現促進剤。

【請求項 6】 MAG 発現促進剤が 4 - [  $\alpha$  - ヒドロキシ - 5 - ( 1 - イミダゾリル ) - 2 - メチルベンジル ] - 3, 5 - ジメチル安息香酸、その光学活性体またはその医薬上許容される塩類である請求項 1 ~ 5 記載の MAG 発現促進剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、MAG 発現促進剤、ミエリン形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患の予防・治療剤に関する。更に詳しくは、4 - [  $\alpha$  - ヒドロキシ - 5 - ( 1 - イミダゾリル ) - 2 - メチルベンジル ] - 3, 5 - ジメチル安息香酸、その光学活性体またはその医薬上許容される塩類を有効成分として含有することを特徴とする MAG 発現促進剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

脊椎動物では多くの情報を高速処理するために有髄神経が発達してきた。有髄神経の特徴である髄鞘はオリゴデンドロサイトあるいはシュワン細胞の細胞質膜が神経軸索を包み込むことによって形成され、多重層の形態をなす。その結果、神経は絶縁されると同時に非常に高い電気抵抗と非常に低い電気容量をもつ。また、ナトリウムチャンネルは髄鞘と髄鞘の切れ目であるランヴィエ絞輪に集積し、インパルスの跳躍伝導を容易にさせ、情報の高速処理 ( 速い神経伝導速度 ) を可能にしている。

【 0 0 0 3 】

髄鞘を形成する主成分はミエリンであり、髄鞘の多重層構造を安定させている成分としてミエリン特異的蛋白が知られている。その内、プロテオリピドプロテイン ( PLP ) および  $P_0$  蛋白はミエリンシート間の架橋・接着に関与し、ミエリン塩基性蛋白 ( MBP ) はミエリンシートの細胞質内に存在しシートの緻密化に関与する ( Morell P. et al., in Basic Neurochemistry, Siegel GJ et al. Eds. Rav

an Press, p.117-143(1994) )。一方、軸索とミエリンシートの接着に関与しているのがミエリン関連糖蛋白 (MAG) である (Quarles RH, Myelin-associated glycoprotein: functional and clinical aspects, in Neuronal and Glial Proteins: Structure, Function and Clinical Application, Marangos PJ et al. Eds. Academic Press, New York, p.295(1988))。

#### 【0004】

MAG はイムノグロブリンスーパーファミリーに属し、電気泳動上の移動度は100-kDa である。MAGはミエリン形成の開始時に中枢神経系ではオリゴデンドロサイトによって、また末梢神経系ではシュワン細胞によって産生される。MAG のミエリンに占める割合は中枢神経系で1%、末梢神経系で0.1%にすぎないが、最近、単純な接着分子としての役割のみならず、後述するように、髄鞘の形成と維持に積極的に関与していることが明らかとなってきた。

#### 【0005】

In vitroにおいてMAG を過剰発現させたシュワン細胞ではミエリン形成が促進されるのに対し (Owens GC et al., J. Cell Biol., 111, p.1171-1182(1990))、MAG の発現を低下させたシュワン細胞ではミエリン形成が抑制される (Owens GC et al., Neuron, 7, p. 565-575(1991))。In vivoにおいてMAG 欠損マウスの有髄神経数は減少し、無髄神経数が増大するが、ミエリン形成速度の低下が関与していると考えられている (Bartsch S. et al., Brain Res. 762, 231-234(1997))。一方、軸索とミエリンシートの接触部に形態異常が見られるものの、正常マウスとMAG欠損マウスの有髄神経数、ミエリンシートの厚さ、軸索径に差異がないとの報告 (Li C. et al. Nature, 369, p. 747-750(1994)) もある。したがって、MAG とミエリン形成との関連性については不明な点もいまだ多い。また、ミエリン形成の分子メカニズムについても現在のところ、MAGが軸索の受容体と結合することによって、Fyn チロシンキナーゼが活性化され、(Umemori H et al., Nature, 367, p.572-576(1994))、続いてMBP 遺伝子の発現が促進されることが報告 (Umemori H., J. Neurosci., 19, p.1393-1397(1999)) されているのみで、まだ十分明らかにされているとはいえない。

#### 【0006】

ミエリンの形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする病態には、多発性硬化症 (Multiple sclerosis)、脳炎 (Encephalitis)、脊髄炎 (Myelitis)、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎、重金属中毒、ジフテリア中毒、甲状腺機能低下症、異染性白質変性症、Charcot-Marie-Tooth病などが知られている (安田武司ら、臨床検査、40、p. 760-766(1996))。これらの疾患に対し、インターフェロン、ステロイド、ガンマグロブリン、血漿交換、免疫抑制剤による治療が報告 (祖父江 元、脳と発達、30、p.115-120(1998)、春川 肇ら、日本臨床、55、p.187-194(1997)) されているが、未だ満足される状況にはない。一方、多発性硬化症患者に於いては、発症早期にMAGの消失が観察されていることなどから (Moller JR, Ann. Neurol., 22, p.469-474(1987))、MAGの発現を促進する薬物は上記病態の発症予防・治療に有効であることが期待される。

#### 【0007】

一方、特開昭60-34952号公報、特公昭64-7074号公報、特公平3-16348号公報、特公平4-15781号公報、特公平4-15782号公報、特公平5-29031号公報、特公平5-41143号公報、特公平5-74589号公報には、強力なTXA<sub>2</sub>の生合成阻害作用、血小板凝集抑制作用および血管拡張作用などの薬理作用を有し、血栓症、脳卒中、心筋梗塞、急性心臓死、狭心症、高血圧、ぜん息、腎炎などの予防や治療のために有用な後述する一般式(I)で表される化合物、その光学活性体またはその医薬上許容しうる塩類が開示されている。また、WO97/24333号公報には、これらの化合物中の4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3,5-ジメチル安息香酸、その光学活性体またはその医薬上許容される塩類が糖尿病性合併症予防・治療剤として有用である旨開示されている。

しかしながら、これらの一般式(I)の化合物がMAG産生促進作用を有することは記載も示唆もなされていない。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記の課題を解決しようとするものであり、その目的は、MAG発現促

進剤、ミエリン形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患の予防・治療剤を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、一般式(I)の化合物がMAG発現促進剤、ミエリン形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患の予防・治療剤として有用であることを見出して、本発明を完成するに至った。

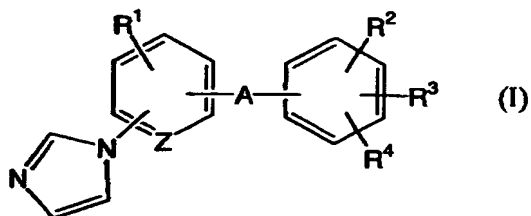
【0010】

すなわち、本発明は、

(1) 一般式(I)

【0011】

【化2】



【0012】

(式中、 $R^1$  は水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシを示す。

$R^2$ 、 $R^3$  は同一または異なって水素、アルキルを示す。

$R^4$  はアルキル、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COOR}^5$ 、 $-\text{CONR}^6\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2\text{NR}^6\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^8$  を示す。

ここで、 $R^5$ 、 $R^8$  はアルキルを示し、 $R^6$ 、 $R^7$  は同一または異なって水素、アルキルを示すか、 $R^6$ 、 $R^7$  が結合して隣接する窒素原子とともに形成するイミダゾールを示す。

Aは $-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-$ を示す。

Zは $=\text{CH}-$ 、 $=\text{N}-$ を示す。)

で表される化合物、その光学活性体またはその医薬上許容される塩類を含有する



MAG 発現促進剤、

(2) MAG 発現促進剤の適応疾患がミエリン形成不全に起因する疾患である  
上記 (1) 記載の MAG 発現促進剤、

(3) MAG 発現促進剤の適応症が髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体と  
する疾患である上記 (1) 記載の MAG 発現促進剤、

(4) MAG 発現促進剤の適応症が多発性硬化症 (Multiple sclerosis)、脳  
炎 (Encephalitis)、脊髄炎 (Myelitis)、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性  
脱髄性多発根神経炎、重金属中毒、ジフテリア中毒、甲状腺機能低下症、異染性  
白質変性症、Charcot-Marie-Tooth 病である上記 (1) 記載の MAG 発現促進剤

(5) MAG 発現促進剤が一般式 (I) 中、 $R^1$  がハロゲン、アルコキシまたは  
アルキルである上記 (1) ~ (4) 記載の MAG 発現促進剤、

(6) MAG 発現促進剤が 4 - [α-ヒドロキシ-5 - (1-イミダゾリル)  
- 2-メチルベンジル] - 3, 5-ジメチル安息香酸、その光学活性体またはそ  
の医薬上許容される塩類である上記 (1) ~ (5) 記載の MAG 発現促進剤、  
に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の MAG 発現促進剤とは、in vitro または in vivo で MAG の発現を遺  
伝子レベルまたはタンパク質レベルで促進させるものであればいずれのものも含  
まれる。

また、ミエリン形成不全に起因する疾患とは、ミエリン形成不全、髄鞘の形成不  
全または髄鞘の破壊を主体とする病態を有するすべての疾患が含まれる。

更に、髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患とは、髄鞘の形成不全  
または髄鞘の破壊を主体とする病態を有するすべての疾患が含まれるが、たとえ  
ば、多発性硬化症 (Multiple sclerosis)、脳炎 (Encephalitis)、脊髄炎 (My  
elitis)、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎、重金属中毒  
、ジフテリア中毒、甲状腺機能低下症、異染性白質変性症、Charcot-Marie-Toot  
h 病等が例示される。

【0014】

本明細書中、一般式 (I) の各記号の定義は次の通りである。

$R^1$  におけるハロゲンとは塩素、臭素、フッ素、ヨウ素が挙げられ、塩素が好ましい。

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$  におけるアルキルとは炭素数 1～10 個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルであって、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、第 2 級ブチル、第 3 級ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等が挙げられ、炭素数 1～4 個のアルキルが好ましい。

$R^1$  におけるアルコキシとは炭素数 1～6 個の直鎖状もしくは分枝鎖状のアルコキシであって、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、第 2 級ブトキシ、第 3 級ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ等を示す。

【0015】

一般式 (I) で示される化合物は、特開昭 60-34952 号公報、特公昭 64-7074 号公報、特公平 3-16348 号公報、特公平 4-15781 号公報、特公平 4-15782 号公報、特公平 5-29031 号公報、特公平 5-41143 号公報、特公平 5-74589 号公報に記載された方法によって合成することができる。

また、本発明の好ましい化合物としては以下の化合物を挙げることができる。

(1) 2-(1-イミダゾリル)- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(2) 2-(1-イミダゾリル)-2', 4', 6'-トリメチルベンゾフェノン

(3) 4-(1-イミダゾリル)- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(4) 3-クロロ-4-(1-イミダゾリル)- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(5) 3-(1-イミダゾリル)- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベ

ンゼンメタノール

(6) 2-クロロ-5-(1-イミダゾリル)- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(7) 5-(1-イミダゾリル)-2-メチル- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベンゼンメタノールおよびその1塩酸塩

(8) 5-(1-イミダゾリル)-2-メトキシ- $\alpha$ -(2, 4, 6-トリメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(9) 5-(1-イミダゾリル)-2-メチル- $\alpha$ -(4-ヒドロキシメチル-2, 6-ジメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(10) 2-クロロ-5-(1-イミダゾリル)- $\alpha$ -(4-ヒドロキシメチル-2, 6-ジメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(11) 5-(1-イミダゾリル)-2-メチル- $\alpha$ -(4-メトキシメチル-2, 6-ジメチルフェニル) ベンゼンメタノール

(12) 4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸およびそのナトリウム塩・1/2水和物

(13) 4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸メチル

(14) 5-(1-イミダゾリル)-2, 2', 6'-トリメチル-4'-(1-イミダゾリルメチル) ベンゾフェノン

(15) 4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸エチル

(16) N-メチル 4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸アミド

(17) 4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-2-クロロ-5-(1-イミダゾリル)ベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸

(18) 4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メトキシベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸

(19) (S)-4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸 (以下、Y-128と称することもある)

る)

(20) 4-[5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸

(21) (S)-4-[ $\alpha$ -ヒドロキシ-5-(1-イミダゾリル)-2-メチルベンジル]-3, 5-ジメチル安息香酸メチル

(22)  $\alpha$ -[2-(1-イミダゾリル)ピリジン-5-イル]-2, 4, 6-トリメチルベンゼンメタノール

【0016】

本発明の化合物の医薬上許容される塩類とは塩酸、臭化水素酸、硫酸などの無機酸、フマル酸、マレイン酸、マンデル酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸などの有機酸との酸付加塩あるいはナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウムなどの金属との塩、リジンなどのアミノ酸との塩などが挙げられ、さらに、それらの1/2水和物、1/3水和物、2/3水和物、1水和物、3/2水和物、2水和物なども含まれる。

【0017】

本発明のMAG発現促進剤は一般的な医薬製剤として調製される。たとえば、本発明の化合物を製剤上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤など）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。

【0018】

固体製剤とする場合は、添加剤、たとえば、ショ糖、乳糖、セルロース糖、D-マンニトール、マルチトール、デキストラン、デンプン類、寒天、アルギネート類、キチン類、キトサン類、ペクチン類、トランガム類、アラビアゴム類、ゼラチン類、コラーゲン類、カゼイン、アルブミン、リン酸カルシウム、ソルビトール、グリシン、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、グリセリン、ポリエチレングリコール、炭酸水素ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、タ

ルクなどが用いられる。さらに、錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、たとえば糖衣錠、腸溶性コーティング錠、フィルムコーティング錠あるいは二層錠、多層錠とすることができる。

#### 【0019】

半固体製剤とする場合は、動植物性油脂（オリーブ油、トウモロコシ油、ヒマシ油など）、鉱物性油脂（ワセリン、白色ワセリン、固形パラフィンなど）、ロウ類（ホホバ油、カルナバロウ、ミツロウなど）、部分合成もしくは全合成グリセリン脂肪酸エステル（ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸など）等が用いられる。これらの市販品の例としては、ウイテプゾール（ダイナミッドノーベル社製）、ファーマゾール（日本油脂社製）などが挙げられる。

#### 【0020】

液体製剤とする場合は、添加剤、たとえば塩化ナトリウム、ソルビトール、グリセリン、オリーブ油、プロピレングリコール、エチルアルコールなどが挙げられる。特に注射剤とする場合は、無菌の水溶液、たとえば生理食塩水、等張液、油性液、たとえばゴマ油、大豆油が用いられる。また、必要により適当な懸濁化剤、たとえばカルボキシメチルセルロースナトリウム、非イオン性界面活性剤、溶解補助剤、たとえば安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。さらに、点眼剤とする場合は水性液剤または水溶液が用いられ、特に、無菌の注射用水溶液があげられる。この点眼用液剤には緩衝剤（刺激軽減のためホウ酸塩緩衝剤、酢酸塩緩衝剤、炭酸塩緩衝剤等が好ましい）、等張化剤、溶解補助剤、保存剤、粘稠剤、キレート剤、pH調整剤（pHは通常約6～8.5に調整することが好ましい）、芳香剤のような各種添加剤を適宜添加してもよい。

#### 【0021】

これらの製剤の有効成分の量は製剤の0.1～100重量%であり、適当には1～50重量%である。投与量は患者の症状、体重、年齢などにより変わりうるが、通常経口投与の場合、成人一日当たり0.01～100mg程度であり、これを一回または数回に分けて投与するのが好ましい。

#### 【0022】

#### 【実施例】

以下に、製剤処方例および薬理作用を挙げて本発明のMAG発現促進剤をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 【0023】

## 製剤例1：フィルムコート錠

Y-128	50.0 mg
D-マンニトール	70.5 mg
トウモロコシデンプン	16.0 mg
炭酸水素ナトリウム	15.0 mg
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	3.0 mg
タルク	5.0 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.5 mg

Y-128、D-マンニトール、トウモロコシデンプンおよび炭酸水素ナトリウムを混合し、ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を噴霧して流動造粒した。造粒物を24メッシュの篩を通した後、タルクおよびステアリン酸マグネシウムを加え、ロータリー式打錠機（菊水製作所）で1錠当たり160mgの錠剤を製造した。次に、この錠剤にヒドロキシプロピルメチルセルロースをフィルムコーティング基剤として1錠当たり6mgのコーティングを施した。

## 【0024】

## 製剤例2：細粒

Y-128	10 %
D-マンニトール	89.5 %
ヒドロキシプロピルセルロース	0.5 %

Y-128とD-マンニトールを混合し、ヒドロキシプロピルセルロース水溶液を加えて練合、造粒し50°Cで乾燥した。造粒物を32メッシュの篩を通して細粒とした。

## 【0025】

## 製剤例3：錠剤

Y-128	50.0 mg
D-マンニトール	30.0 mg

トウモロコシデンプン	19.0 mg
炭酸水素ナトリウム	15.0 mg
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	1.5 mg
タルク	4.0 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.5 mg

Y-128、D-マンニトール、トウモロコシデンプンおよび炭酸水素ナトリウムを混合し、ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を噴霧して流動造粒した。造粒物を24メッシュの篩を通した後、タルクおよびステアリン酸マグネシウムを加え、ロータリー式打錠機（菊水製作所）で1錠当たり120mgの錠剤を製造した。

#### 【0026】

##### 製剤例4：細粒

Y-128	5%
D-マンニトール	92%
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	3%

Y-128とD-マンニトールを混合し、ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を加えて練合、造粒し50°Cで乾燥した。造粒物を32メッシュの篩を通し細粒とした。

#### 【0027】

以下、本発明の医薬の薬理作用を実験例により説明する。

#### 【0028】

##### 実験例1

神経細胞の調製は金承業の方法（脳・神経研究のプロトコール 培養細胞から機能解析へ、御子柴克彦、清水孝雄 編、羊土社）に従った。すなわち、妊娠18日の雌性ラット（Crj: CD(SD)IGS）から胎仔を摘出し、実体顕微鏡下で脊髄後根神経節（DRG）を摘出した。DRGを37°C下で、0.25%トリプシンとDNase I処理することにより、細胞を分散させた。神経細胞以外の付着性細胞を除去した後、ポリリジンコートしたプレートに細胞（5000個）を播種し、NGF（50 ng/mL）を添加した10% FCSを含むDMEM中、炭酸ガス培養器で培養した。培養

3日後、Ara-C ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) を含む培地に交換し、神経細胞以外の増殖性の細胞を排除した。

シュワン細胞の調製は松岡一郎の方法 (Springerニューロサイエンス・ラボマニュアル1、畠中 寛 編、シュープリンガー・フェアラーク東京) に従った。すなわち、実体顕微鏡下で、新生仔ラット (生後1~3日、(Crj: CD(SD)IGS)) の坐骨神経を摘出し、外膜を除去した。CMF-HBSS中トリプシン・コラゲナーゼとDNase Iで処理することにより、細胞を分散させ、培養用フラスコを用い10% FCSを含むDMEM中、炭酸ガス培養器で培養した。Ara-C を含む培地中で培養した後、細胞を回収し、その細胞浮遊液を順次、抗Thy 1. 1、ウサギ補体で処理することにより、シュワン細胞以外の細胞を排除した。コラーゲンコートした培養用フラスコを用い10% FCSを含むDMEM中、炭酸ガス培養器で培養した。

#### 【0029】

DRG 神経細胞の培養開始から1週間後、シュワン細胞 (20, 000個) をDRG 神経細胞を培養しているプレートに播いた。共培養の培地は  $2 \mu\text{mol/L}$  forskolin、50 ng/mL NGF、10% FCSを含むDMEMとした。翌日、シュワン細胞が定着してからジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した本発明化合物 (Y-128) ( $3 \mu\text{mol/L}$ ) あるいは陽性対照化合物としてアスコルビン酸 ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) を2-3日毎に添加した。また、陰性対照化合物としては媒体であるDMSOを同様に処置した。共培養開始から2週間後、Eldridge CFらの方法 (J. Cell Biol., 105, p. 1023-1034(1987)) に従い、ミエリンを染色した。すなわち、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で細胞を固定し、一晩4℃で保存した。ホルマリン溶液を除去した後、0.1% オスミウム酸溶液で1時間再固定した。Sudan Black B 染色液で30分間染色した。染色したサンプル (各群12ウェル) を顕微鏡下で観察し、ウェル中でもっとも顕著に軸索が染色されている部分を1視野選び、ポラロイドカメラで撮影した。媒体添加群では、すべてのウェル中の軸索は染色されなかった。アスコルビン酸添加群では、すべてのウェル中の軸索は強く染色された。本発明化合物 (Y-128) 添加群 ( $3 \mu\text{mol/L}$ ) では、42%のウェル中の軸索が染色された。図1~3に各群の染色した軸索の写真を示す。

#### 【0030】



上記実験例により、本発明化合物（Y-128）は軸索のミエリン化を促進させた。

#### 【0031】

##### 実験例 2

実験例 1 に記述した方法にて DRG 神経細胞とシュワン細胞を共培養した。本発明化合物（Y-128）（1、3、10、30  $\mu\text{mol/L}$ ）あるいは陽性対照化合物としてアスコルビン酸（50  $\mu\text{g/mL}$ ）を含有する DMSO 溶液を 2 日毎に 2 週間培地に添加した。なお、陰性対照化合物として媒体である DMSO を同様に添加した。化合物の添加を開始してから 2 週間後、培地を除去し、ウェルにドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含むサンプルバッファーを添加し細胞を可溶化した。その一部をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、泳動されたタンパク質を PVDF 膜に転写した。免疫ブロット法と化学発光により、目的のタンパク質を X 線フィルム上に検出した。約 100 kDa の泳動位置に検出されたバンドをミエリン関連タンパク質（MAG）のシグナルと同定した。X 線フィルムをスキャニングして画像をコンピュータに取り込み、解析ソフトウェア ImageQuaNT（Molecular Dynamics 社）を用いて MAG の発現量を半定量した。図 4 にその X 線フィルムによる MAG の発現量の様子を示す。

#### 【0032】

上記実験例より、本発明化合物（Y-128）は 3  $\mu\text{mol/L}$  の濃度から MAG の産生を増加させた。

#### 【0033】

##### 実験例 3

実験例 1 に記述した方法にて DRG 神経細胞とシュワン細胞を共培養した。本発明化合物（Y-128）（10  $\mu\text{mol/L}$ ）あるいは陽性対照化合物としてアスコルビン酸（50  $\mu\text{g/mL}$ ）を含有する DMSO 溶液を 2 日毎に培地に添加した。なお、陰性対照化合物として媒体である DMSO を同様に添加した。化合物の添加を開始前、および開始してから 3、6、9、12、15、18 日後、実験例 2 と同様に、MAG を定量した。図 5 にその結果を示す。

#### 【0034】

上記実験例より、本発明化合物（Y-128）は添加6および12日後に極大としてMAGの産生を増加させ、18日後にMAGの産生は消失した。本発明化合物（Y-128）によるMAG産生の経時変化は陽性対照化合物のアスコルビン酸と同等であった。

【0035】

#### 実験例4：実験的アレルギー性脳脊髄炎

（EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)）

モルモットのミエリン塩基性蛋白は脊髄ホモジネートを酸抽出した後、硫酸アンモニウム沈殿させ調製する。ミエリン塩基性蛋白と同量のFreundの完全アジュバント（4 mg/mLのMycobacteria H37Raを含む）とを混合させ、エマルジョン化させる。8-12週齢の雌性Lewisラットの後肢の足裏に調製したエマルジョンを（0.1 ml）を一回注射する。Y-128（10 mg/kg）をEAE誘導直後から一日一回4週間経口投与する。最終投与後、ラットの症状を下記のようにスコア化し、効果を判定する。

0：症状無し	1：ダラリとした尻尾	2：後肢麻痺
3：四肢すべての麻痺	4：瀕死の状態	5：死亡

【0036】

#### 実験例5：アレルギー性神経炎

（EAN (Experimental Autoimmune Neuritis)）

100 μgの蛋白ペプチド（牛P2蛋白のアミノ酸配列の内53-78に相当）と同量のFreundの完全アジュバント（0.5 mg/mLのMycobacterium tuberculosisを含む）とを混合させ、エマルジョン化させる。6-8週齢の雌性Lewisラットの後肢の足裏に調製したエマルジョンを（0.1 ml）を一回注射する。Y-128（10 mg/kg）をEAN誘導直後から一日一回4週間経口投与する。最終投与後、ラットの症状を下記のようにスコア化し、効果を判定する。

0：症状無し	1：力が減弱した尻尾	2：ダラリとした尻尾
3：正向維持の障害	4：正向維持の消失	5：失調性歩行
6：後肢の軽度な麻痺	7：重度の麻痺	8：四肢の不全麻痺
9：瀕死の状態	10：死亡	

【 0 0 3 7 】

【発明の効果】

上記製剤処方例、薬理実験例、およびその他の薬理実験により、本発明の医薬は、MAG発現促進剤、ミエリン形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患の予防・治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

軸索のミエリン化に対するDMSO添加時の効果を示す。

【図 2】

軸索のミエリン化に対するアスコルビン酸添加時の効果を示す。

【図 3】

軸索のミエリン化に対する本発明化合物添加時の効果を示す。

【図 4】

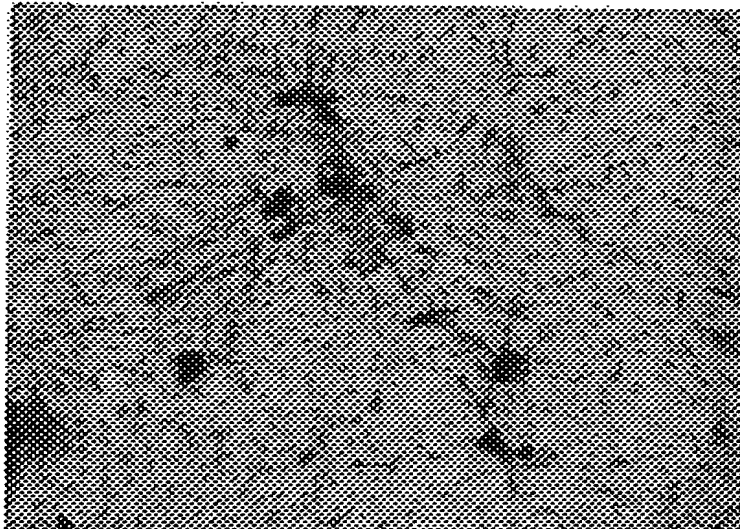
培養細胞中のMAG発現量に対する本発明化合物の効果を示す。

【図 5】

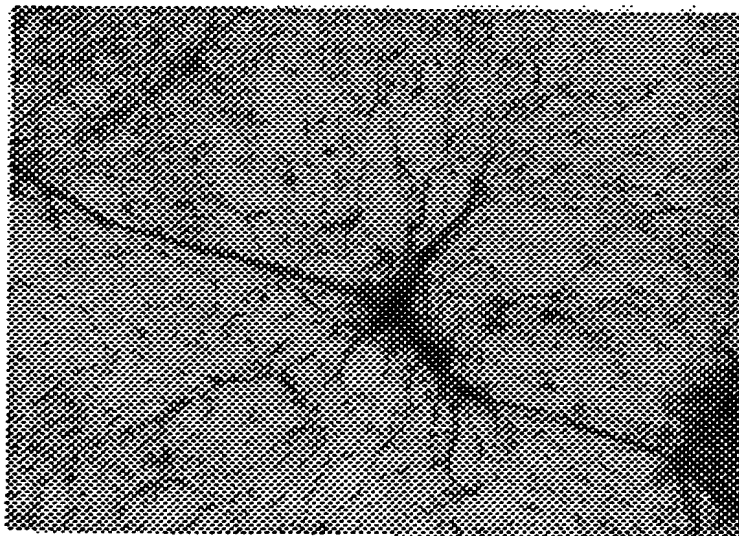
本発明化合物添加後の培養細胞中のMAG発現量の経時変化を示す。

【書類名】 図面

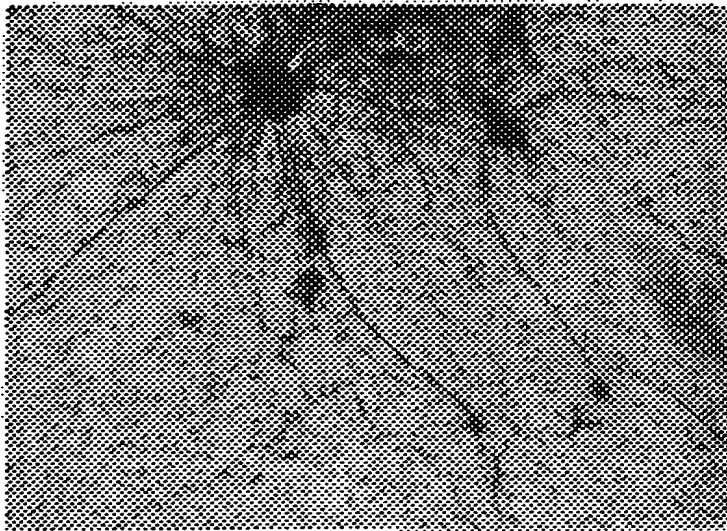
【図 1】



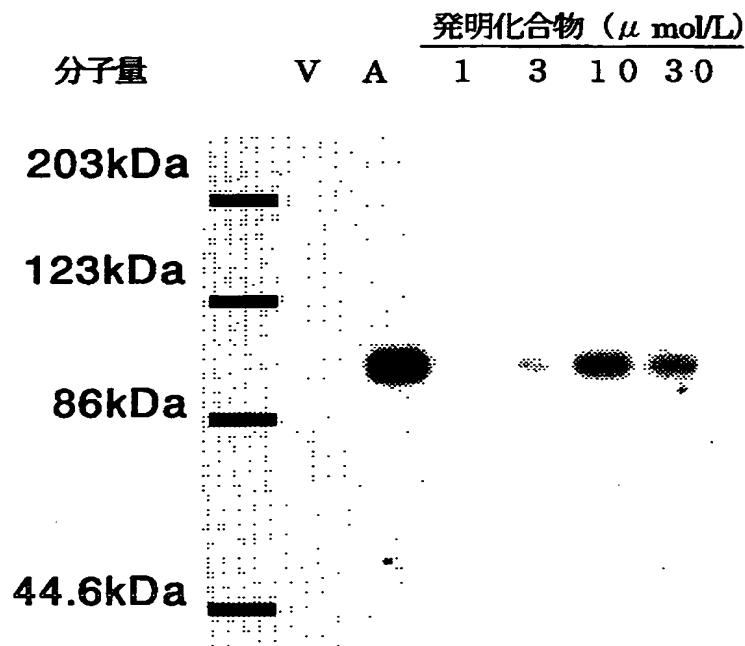
【図 2】



【図 3】



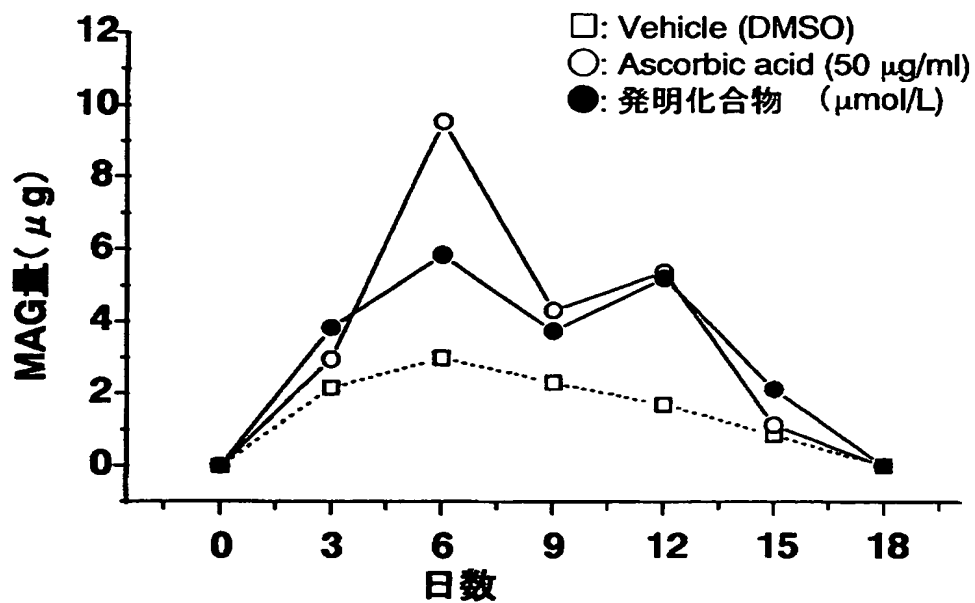
【図 4】



V: DMSO、A: アスコルビン酸 ( $50 \mu$  g/mL)

培養細胞中の MAG 発現量に対する発明化合物の効果

【図5】



発明化合物添加後の MAG 発現量の経時変化

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、有用なMAG発現促進剤、ミエリン形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患の予防・治療剤を見出すことにある。

【解決手段】 本発明の一般式（I）の化合物、たとえば、4-〔 $\alpha$ -ヒドロキシ-5-（1-イミダゾリル）-2-メチルベンジル〕-3, 5-ジメチル安息香酸、その光学活性体またはその医薬上許容される塩類は、MAG発現促進作用およびその他の諸作用を有することから、MAG発現促進剤、ミエリン形成不全、ひいては髄鞘の形成不全または髄鞘の破壊を主体とする疾患の予防・治療剤として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006725]

1. 変更年月日 1990年 8月15日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号  
氏 名 吉富製薬株式会社
2. 変更年月日 2000年 4月 1日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号  
氏 名 ウェルファイド株式会社